

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(A4)

世界知的所有権機関

国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07K 17/08, 14/475, A61K 38/18, 47/34	A1	(11) 国際公開番号 WO96/28475
		(43) 国際公開日 1996年9月19日(19.09.96)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00599 (22) 国際出願日 1996年3月7日(07.03.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/79669 1995年3月10日(10.03.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中村敏一(NAKAMURA, Toshikazu)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市高見台10-27 Osaka, (JP) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2-2-8 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 並木充夫(NAMIKI, Mitsuo)[JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市桜が丘1番12号 Hyogo, (JP) 楠瀬直人(KUSUNOSE, Naoto)[JP/JP] 〒567 大阪府茨木市桑田町2番1号342 Osaka, (JP) 秋丸憲子(AKIMARU, Noriko)[JP/JP] 〒662 兵庫県西宮市北昭和町11-18 ル・パティオ301 Hyogo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PEG-MODIFIED HGF</p> <p>(54) 発明の名称 P E G化H G F</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A hepatocyte growth factor (HGF) modified with polyethylene glycol (PEG), which has a retarded clearance <i>in vivo</i>, effectively exhibits its physiological activity for a prolonged period of time and yet sustains the physiological activity of unmodified HGF, which makes it possible to reduce the dose and relieve the side effects of the same.</p>		

(57) 要約

本発明はPEG化HGF、即ち、ポリエチレングリコールで修飾されたHGF（肝細胞増殖因子）に関する。本発明のPEG化HGFは、生体内クリアランスが遅延され、長時間有効にその生理活性を示し、しかも非修飾HGFの有する生理活性をそのまま有するので、投与量及び副作用の低減を図ることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LK	ゼントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	ES	エストニア	LR	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	FIR	フィンランド	LT	リエソト	SDE	スードアン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LUV	ルクセンブルグ	SSG	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GAB	ガボン	LV	ラトヴィア	SSK	シロヴェニア
BB	バルバドス	GAB	ギヨリス	MC	モナコ	SSN	スロヴァキア
BE	ベルギー	GEN	グルジア	MD	モルドバ共和国	SZ	セネガル
BF	ブルガニア・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SD	スワジ兰ド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TG	チヤゴ
BJ	ベナン	HUE	ハンガリー		ヴィニア共和国	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TM	トルコメニスタン
BY	ベラルーシ	ISL	イスラエル	MN	モンゴル	TR	トルニダード・トバゴ
CA	カナダ	IT	イスランド	MR	モーリタニア	TT	トリニティ・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	JPE	イタリア	MW	マラウイ	TUAG	トクリーナ
CG	コンゴ	KEN	日本	MX	メキシコ	UUS	ウガンダ
CH	スイス	KG	ケニア	NE	ニジェール	UZ	アメリカ合衆国
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NL	ニジニンダ	VN	ウズベキスタン
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノールウェー		ヴィエトナム
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド		
CZ	キューバ	KZ	カザフスタン				

明細書

PEG化HGF

5 技術分野

本発明は、PEG化HGF、即ち、ポリエチレングリコール(PEG)を含む試剤で修飾されたHGF(Hepatocyte Growth Factor)に関する。さらに、このPEG化HGFを含む肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤、皮膚化粧剤に関する。

10 従来の技術

HGF(肝細胞増殖因子)は肝細胞をはじめ多くの上皮細胞の増殖制御のみならず、細胞運動の促進や三次元での組織構築を促す形態形成誘導作用など多用な生物活性を有するユニークなサイトカインであり、マイトゲン、モートゲン、そしてモルフォゲンとして組織器官の形成や再生に中心的な役割を担うことが明かとなってきている。

15 HGFは分子量約69kDの α 鎖と約34kDの β 鎖からなるヘテロダイマー蛋白質であり、全体として82-85kDの分子量をもつ。

このHGFは肝細胞のみならず、腎尿細管上皮細胞、皮膚ケラチノサイト、メラノサイト、肺胞II型上皮細胞、胃粘膜上皮細胞、血管内皮細胞、その他の上皮系細胞株などさまざまな細胞に対し増殖促進因子として作用する。

20 HGFは多くの正常細胞に対して増殖促進活性を示す一方で、これらの細胞が癌化すると逆に増殖抑制活性を示すことが知られている(Tajima, H. et al., FEBS Lett., 231, 229, 1991)。

また、HGFは腎尿細管由来の正常上皮細胞であるMDCK細胞をはじめ多くの上皮細胞の運動性を亢進し、培養細胞のコロニーを分散させるモートゲンとして作用する。

さらに、HGFはMDCK細胞の形態形成を誘導することも知られている(Montesano, R. et al., Cell, 67, 901, 1991)。

そのほかにもHGFは、代表的な肝臓毒である四塩化炭素によって引き起こされる培養肝細胞からの可溶性酵素の遊離を著しく抑制する。すなわち、HGFはin vitroで抗肝炎作用を発揮する。しかもHGFの抗肝炎作用はin vivoでも確認されている(Takehara, T. et al., Biomed. Res., 12, 335, 1991)。

さらにHGFは、腎尿細管由来の上皮細胞のNa-K-ATPase活性を促進する事が知られており腎機能を亢進することが示唆されている(Ishibashi, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 182, 960, 1992)。

しかしながら、上記のHGFのようなタンパク質を生体内に投与する際の問題点の一つとして、生体内クリアランスが非常に速いという点と、ヒト型の天然タンパク質以外には抗原性があるという点が挙げられる。

このようなタンパク性医薬品の有する問題点を解決するための有用な手段のひとつとして、PEG化試剤によってタンパク質を修飾することにより、生体内クリアランスを遅延させたり、抗原性を低下させることが知られている(Yoshimoto, T. et al., Jpn. J. Cancer Res., 77, 1264, 1986; 日本特開昭56-23587号公報; 日本特開昭61-178926号公報; Abuchowski, A. et al., Cancer Biochem. Biophys., 7, 175, 1984; 日本特開昭62-115280号公報など)。

上述のようにHGFは、様々な生物活性を有しており、その関連物質を医薬として応用する技術の開発が望まれている。特にHGFの肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤、皮膚化粧剤としての利用は応用価値の高いものと考えられるが、十分な薬効を得るために数十 μ g/kg～数mg/kgのHGFの投与が必要で、生理活性タンパク質としては必要量が多い。このことは予期せぬ副作用の発生及びバイオ製品の製造コストが高くなるという点で不利であった。

すなわち、HGFは血中における半減期が極めて短い(α相: 約2分、

β 相：約 20 分）ことが知られており、医薬品化を考慮した場合、HGF の生体内でのクリアランスの改善が最大の課題となる。

しかしながら、上記のように肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤、皮膚化粧剤として有用なPEG化 HGF を実際の医療に応用するための体内動態の改善や高活性化させるためのアプローチは、従来なし得られていないのが実状である。

従って、本発明の目的は、HGF の有する生物活性を生体内で持続させることによって投与量を減らし、かつ臓器特異性を高めるために、PEG 化試剤を HGF と縮合させることにより、医薬品として極めて有用な PEG 化 HGF を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、HGF を PEG 化することで得られる PEG 化 HGF は、生体内での安定性が改善されて、HGF 作用を長期にわたって持続させることができ、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

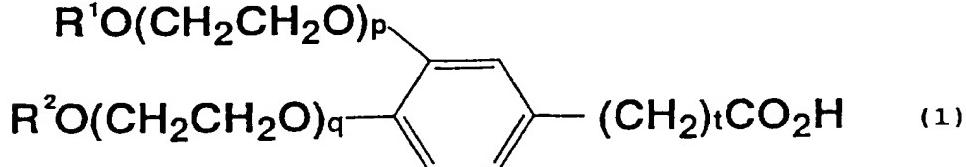
本発明は、PEG 化 HGF に関する。

また、本発明の他の発明は、

リジン及びタンパクの N 末端アミノ基を修飾する PEG 化試剤で修飾した HGF からなる PEG 化 HGF；

アミド結合を介してリジン及びタンパクの N 末端アミノ基を修飾する PEG 化試剤で修飾した HGF からなる PEG 化 HGF；

下記一般式 (1)

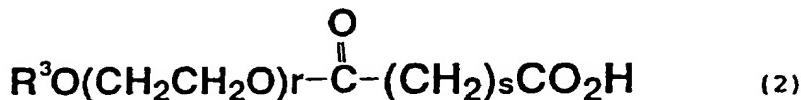


(式中、R¹ 及び R² は同一又は異なる低級アルキル基を、p 及び q は同一

又は異なって 20 ないし 280 の整数を表し、t は 0 又は任意の正の整数を表す) で示される PEG 化試剤のカルボキシル基を活性化して HGF と反応させることによって得られる PEG 化 HGF ;

下記一般式 (2)

5



(式中、R³ は低級アルキル基を、r は 20 ないし 280 の整数を表し、s は任意の正の整数を表す) で示される PEG 化試剤のカルボキシル基を活性化して HGF と反応させることによって得られる PEG 化 HGF ;

上記の PEG 化 HGF の有効量及び必要に応じて担体を含有する肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤 15 又は皮膚化粧剤；及び

肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤又は皮膚化粧剤を製造するための PEG 化 HGF の使用に関する。

20

図面の簡単な説明

図 1 は、PEG 化 HGF の肝細胞増殖活性を示す図である。

図 2 は、PEG 化 HGF の血中動態を示す図である。

図 3 は、PEG 化 HGF の in vivo における蛋白 (フィブリノーゲン) 25 産生亢進作用を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明に用いられる HGF としては、種々の方法で調製されたものを用いることができる。

HGF の調製方法としては、各種の方法が知られている。例えば、ラッ 30

ト、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、腎臓、胎盤などの臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる (FEBS Letters, 224, 312, 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5844, 1989など参照)。

5 また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物（培養上清、培養細胞等）から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる（例えば、Nature, 342, 440, 1989；日本特開平5-111383号公報；日本特開平3-255096号公報；Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989など参照）。

10 上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

15 より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィー、HPLCなどの通常の蛋白質精製法にて精製することができる。

20 また、HGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を通常の遺伝子工学的な手法により動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、マウスC127細胞、サルCOS細胞、Sf (Spodoptera frugiperda) 細胞などに形質転換し、その培養上清より得ることができる。HGFはヒト由来のものでも、哺乳動物由来のものでも用いることができるが、好ましくはヒト由来のものが良く、更に好ましくは、ヒト由来の組換えHGF（日本特開平5-111383号公報）が良い。

25 かくして得られたHGFはHGFと実質的に同効である限り、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸に置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上

のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されていてもよい。

PEG化とはPEG化試剤でタンパク質を修飾することを表す。

PEG化試剤とは、ポリエチレングリコール(PEG)部分：

5 $-O-(CH_2CH_2O)_n-$

(式中、nは20ないし280の整数を表す)

及び、タンパク質との結合部分をもつ試剤を表す。

PEG化試剤としては、多種類のものがあるが、例えば、下記の3つの群が挙げられる。

10 1. リジン及びタンパクのN末端アミノ基を修飾するPEG化試剤

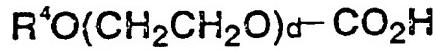
リジン及びタンパクのN末端アミノ基を修飾するPEG化試剤としては、タンパク質との結合部分としてカルボキシル基、誘導されたカルボキシル基、炭酸エステル、ホルミル基等を持つものがあり、例えば、以下の刊行物に記載されたものが挙げられる。

15 ① アミド結合を介してHGFを修飾する試剤

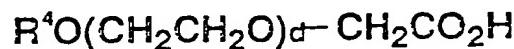
- 1) Tetrahedron, 40, 1581 (1961).
- 2) Anal. Biochem., 131, 25 (1983).
- 3) Cancer Biochem. Biophys., 7, 175 (1984).
- 4) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1487 (1987).
- 20 5) FEBS Letters, 223, 361 (1987).
- 6) 日本特開昭61-249388号公報
- 7) 日本特開平1-316400号公報
- 8) 日本特開平4-108827号公報

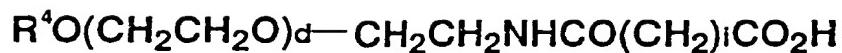
以下に刊行物に記載のある試薬を例示する。

25

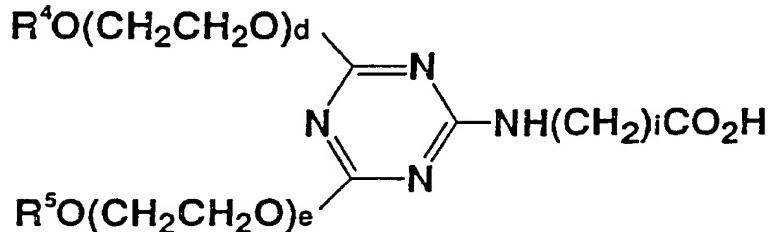


30

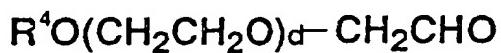




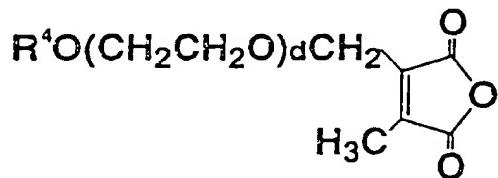
5



10



15



20



(式中、 R^* 及び R° は同一又は異なる低級アルキル基を、 d 及び e は同一又は異なって20ないし280の整数を表し、 i は任意の正の整数を表す)

これらの試剤において、 i は好ましくは1ないし10の範囲がよく、さらに好ましくは1ないし4の範囲がよい。

② ①以外の結合を介してHGFを修飾する試剤

1)J. Biol. Chem., 257, 3578 (1977).

30 2)Chem. Lett., 773 (1980).

3) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 29, 113 (1980).

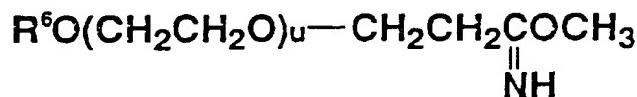
4) Agr. Biol. Chem., 52, 1575 (1988).

5) J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 2, 61 (1991).

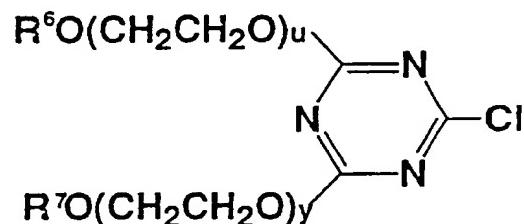
6) 日本特開昭61-178926号公報

5 7) 日本特開昭63-10800号公報

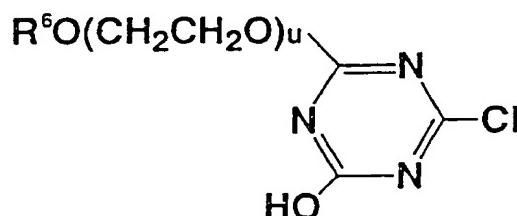
以下に刊行物に記載のある試薬を例示する。



10



15



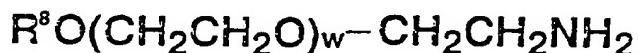
20

25 (式中、R'及びR'は同一又は異なる低級アルキル基を、u及びyは同一又は異なって20ないし280の整数を表す)

2. アスパラギン酸、グルタミン酸及びタンパク質のC末端カルボキシル基を修飾するPEG化試剤

30 アスパラギン酸、グルタミン酸及びタンパク質のC末端カルボキシル基を修飾するPEG化試剤としては、タンパク質との結合部分としてアミノ

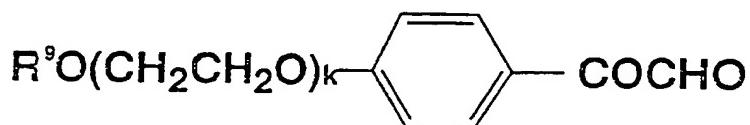
基等を持つものがあり、例えば、日本特開昭56-23587号公報に記載された下記の試剤等が挙げられる。



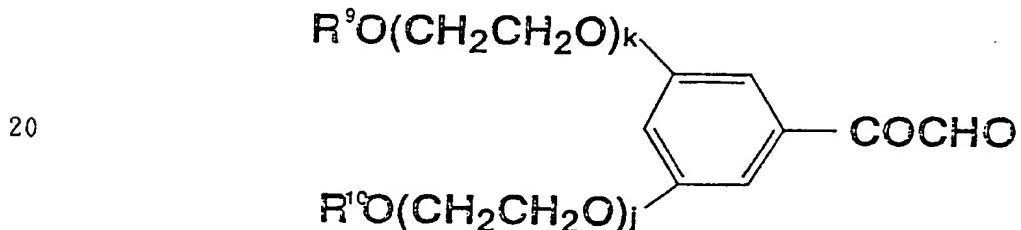
5 (式中、R⁸は低級アルキル基を、wは20ないし280の整数を表す)

3. アルギニンのグアニジノ基を修飾するPEG化試剤

10 アルギニンのグアニジノ基を修飾するPEG化試剤としては、ポリペプチド又はタンパク質との結合部分としてフェニルグリオキサール等を持つものがあり、例えば、日本特開平2-117920号公報、日本特開平3-88822号公報などに記載された下記の試剤等が挙げられる。



15



20 (式中、R⁹及びR¹⁰は同一又は異なる低級アルキル基を、k及びjは同一又は異なって20ないし280の整数を表す)

25 好ましいPEG化試剤としてはリジン及びタンパクのN末端アミノ基を修飾するPEG化試剤が挙げられ、さらに好ましくはアミド結合を介してリジン及びタンパクのN末端アミノ基を修飾するPEG化試剤が挙げられる。

30 PEG化試剤は通常の有機化学の分野で用いられる方法によって製造でき、例えば、上記の刊行物に記載の方法で製造できる。

PEG化試剤を用いてPEG化HGFを調製する方法は、通常の有機化学の分野で用いられる方法によることができ、例えば、上記の刊行物に記載の方法が挙げられる。

5 1分子中に1つのカルボキシル基を有するPEG化試剤を用いたPEG化HGFの調製方法を、一例として以下に説明する。

本PEG化試剤を用いたPEG化は以下の2段階の反応によって実施できる。

1. PEG化試剤のカルボキシル基を活性化してカルボキシル基を活性化体とする段階

10 カルボキシル基の活性化方法としては活性エステル法、混合酸無水物法等があり、例えば生化学実験講座第一巻、タンパク質の化学IV P236～242(東京化学同人発刊)、ペプチド合成の基礎と実験(泉屋ら、丸善発刊)に記載されているカルボキシル基の活性化方法より活性化することができる。

15 具体的には、活性エステルの場合、p-ニトロフェニルエステル、チオフェニルエステル、p-ニトロチオフェニルエステル、1, 3, 5-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、シアノメチルエステル、及びN-ヒドロキシタルイミドエステルやN-ヒドロキシクシンイミドエステルなどのジカルボン酸イミドエステル、またN-ヒドロキシビペリジンエステルやN-ヒドロキシ5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボン酸イミドなどのヒドロキシルアミン系活性エステルなどが挙げられる。

25 これらの活性エステルの調製は、通常のエステルの合成法にしたがって製造でき、例えば、PEG化試剤のカルボキシル基と上記の活性エステルに対応するアルコール体とをジシクロヘキシルカルボジイミドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等の縮合剤を用いて-20℃ないし室温にて1ないし24時間反応させることによって実施できる。

30 あるいはPEG化試剤のカルボキシル基と上記の活性エステルに対応するハロゲン化物とを、トリエチルアミン等の塩基存在下、0℃ないし80

°Cにて1ないし72時間反応させることによっても調製できる。

こうして調製した活性エステルのうち不安定なものは後処理後、直ちに次の縮合反応に用いるが、比較的安定なものは単離することができ、場合によっては低温あるいは室温で長期保存することもできる。

5 混合酸無水物法の場合には、イソブチルクロロホルメート、エチルクロロホルメート、塩化ピバロイル、塩化イソバレリル及び塩化ジフェニルホスフィル等とN-メチルモルホリン、N-エチルピペリジン等の塩基存在下、-20°Cないし0°Cにて1ないし30分間反応させることによって系内で混合酸無水物を調製する。こうして調製した化合物は単離・精製することなく次の反応に用いる。

2. カルボキシル基を活性化したPEG化試剤とHGFを反応させる段階

カルボキシル基を活性化したPEG化試剤とHGFとの反応においては、反応の温度はHGFが失活しない温度であればいずれでも良く、例えば0～25°Cの範囲が好ましい。

15 また、その使用量比は、HGF 1モル当たり5～100モルのPEG化試剤を用いれば良いが、リジン及びタンパク質のN末端アミノ基を修飾する際にはHGF 1モル当たり10～25モルのPEG化試剤を用いるのが特に好ましい。

本発明において用いられる式(1)又は(2)のPEG化試剤は、pH 5.5以上のいずれのpHでも反応させることができるので、反応のpHはHGFが失活しないpH 5.5以上であればいずれでも良いが、pH 7～9の範囲が好ましい。

25 反応に用いる溶媒は、反応を妨害しないものであればいずれでもよく、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸ナトリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、N-エチルモルホリン-酢酸緩衝液、マレイン酸ナトリウム緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等の緩衝液が挙げられる。

30 また、HGFを失活させず、かつ反応に不活性な有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、プロパンノール等の低級アルコールやアセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等を添加してもよい。

反応時間は1～72時間で充分である。

反応終了後に、反応液を塩析やゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、限外濾過、逆相HPLCなどの通常の蛋白質の精製法で精製して目的のPEG化HGFを得ることができる。

本発明で使用されるPEG化試剤において、R¹～R⁴で表される低級アルキル基とは、直鎖又は分岐鎖の炭素数が1～6のアルキル基などが挙げられ、たとえば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられる。

本発明のPEG化HGFは種々の製剤形態（たとえば、液剤、固形剤、カプセル剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるPEG化HGFのみ、又はそれと慣用の担体と共に注射剤とされるか、又は慣用の担体と共に経口剤とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、PEG化HGFを適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水など）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、ついで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中のPEG化HGF含量としては、通常0.0002～0.2(W/V%)程度、好ましくは0.001～0.1(W/V%)程度に調整される。これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。製剤中のPEG化HGFの含量は、剤形、適用疾患などに応じて適宜調整することができる。

製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤などを含んでいても良い。溶状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

本発明の製剤は、該製剤の形態に応じた適当な投与経路により投与される。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重等に基づいて適宜

調整されるが、通常はPEG化HGF中のHGF含量として $0.1\mu\text{g}/\text{kg}\sim10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

5 産業上の利用可能性

本発明のPEG化HGFは、そのタンパク質部分を介してHGFと同様の機序で細胞に作用すると考えられる。そのためHGFとして種々の生物活性を示す。

特に、PEG化試剤(1)及び(2)で修飾されたHGFは、対応する非修飾HGFと比較すると体内動態が改善された化合物であり、かつ非修飾HGFにくらべて臓器特異的に作用し、かつ低用量でHGF活性を示す。

すなわち、PEG化HGFは、生体内クリアランスが遅延（即ち持続性が延長）され、長時間有効にその生理活性を示しうる。しかも、本発明のPEG化HGFは非修飾HGFの有する生理活性をそのまま有するものである。従って、本発明のPEG化HGFは、肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤、皮膚化粧剤などとして有用である。

20

実施例

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの例によって制限されるものではない。

なお、以下の実施例において、アミノ酸分析値とは、これら高分子修飾HGFの酸分解物（6N塩酸-フェノール、110°C、24時間処理後の分解物）中のアミノ酸分析値を表す。

また、これらPEG化HGFのアミノ基修飾率は、トリニトロベンゼンスルホン酸法 (Methods in Enzymology, Vol.25, p464 (1972)., Academic Press, New Yorkに記載の方法) により未修飾HGFとの比較を行うことで算出した。

各略号は以下の通りである。

A s x : アスパラギン酸又はアスパラギン

G l x : グルタミン酸又はグルタミン

S e r : セリン G l y : グリシン

5 H i s : ヒスチジン A r g : アルギニン

T h r : スレオニン A l a : アラニン

P r o : プロリン T y r : チロシン

V a l : バリン M e t : メチオニン

I l e : イソロイシン L e u : ロイシン

10 P h e : フェニルアラニン L y s : リジン

実施例 1

3, 4-ビス-メトキシポリエチレングリコール ハイドロ桂皮酸修飾H

G F

15 HGF 3. 90 mg を溶解した 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6. 0, 0. 3M-NaCl) 6. 9 ml に 1N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 8. 25 に調整させた後、3, 4-ビス-メトキシポリエチレングリコール ハイドロ桂皮酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (平均分子量約 10000) 3. 14 mg (アミノ基に対して 0. 15 eq.) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液に 0. 1N 塩酸を加えて pH 6. 5 としたのち セファクリル S-200 HR (2. 6 cmφ × 90 cm) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (溶出液: 0. 2M 食塩水, 流速: 1. 4 ml/min, 検出波長: 220 nm) で精製した。目的のフラクションを集め、限外濾過 (アミコン YM-5) によって脱塩濃縮し、表題化合物を含む水溶液 750 μlを得た。(蛋白含量 3. 713 mg/ml, アミノ基修飾率: 19%)

アミノ酸分析値

A s x 63. 2 (83), G l x 50. 5 (59),

S e r 30. 1 (38), G l y 54. 0 (57),

30 H i s 20. 2 (22), A r g 33. 3 (41),

Th r 31. 9 (38), A l a * 21. 0 (21),
 P ro 35. 0 (44), T yr 24. 4 (32),
 V al 26. 5 (33), M et 11. 4 (15),
 I le 32. 1 (37), L eu 35. 3 (37),
 5 P he 16. 0 (17), L ys 41. 4 (41),
 C ys - (40)

*基準アミノ酸、()内は理論値、-は未測定

GPC

カラム: T S K g e l G 3 0 0 0 S W

10 7. 5 mmφ × 6 0 0 mm (東ソー社製)

溶出液: 1 0 mMトリス緩衝液, 0. 2 M食塩水, 0. 0 5 % S D S

流速 : 0. 6 ml / 分

検出波長: 2 2 0 n m

保持時間: 1 8. 5 1 7 分

15

実施例 2

3, 4-ビスマートキシポリエチレングリコール ハイドロ桂皮酸修飾H G F

20 H G F 3. 9 0 m g を溶解した 3 0 mM リン酸緩衝液 (p H 6. 0, 0. 3 M-N a C 1) 6. 9 m l に 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて p H 8. 2 5 に調整させた後、3, 4-ビスマートキシポリエチレングリコール ハイドロ桂皮酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (平均分子量約 1 0 0 0 0) 6. 2 9 m g (アミノ基に対して 0. 3 e q.) を 加え、室温で 1 8 時間攪拌した。

25 反応液に 0. 1 N 塩酸を加えて p H 6. 5 としたのち セファクリル S - 2 0 0 H R (2. 6 cmφ × 9 0 cm) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (溶出液: 0. 2 M 食塩水, 流速: 1. 4 m l / m i n, 検出波長: 2 2 0 n m) で精製した。目的のフラクションを集め、限外濾過 (アミコン YM-5) によって脱塩濃縮し、表題化合物を含む水溶液 1. 0 0 m l を 30 得た。 (蛋白含量 3. 7 2 2 m g / m l, アミノ基修飾率: 3 2 %)

アミノ酸分析値

Asx 64.4 (83), Glx 52.2 (59),
 Ser 30.6 (38), Gly 54.8 (57),
 His 20.2 (22), Arg 33.7 (41),
 5 Thr 32.5 (38), Ala* 21.0 (21),
 Pro 35.4 (44), Tyr 25.2 (32),
 Val 26.8 (33), Met 12.5 (15),
 Ile 32.8 (37), Leu 35.7 (37),
 Phe 16.2 (17), Lys 41.9 (41),
 10 Cys - (40)

* 基準アミノ酸、() 内は理論値、-は未測定

G P C

カラム: TSK gel G3000SW

7.5 mmφ × 600 mm (東ソー社製)

15 溶出液: 10 mMトリス緩衝液, 0.2 M食塩水, 0.05% SDS
 流速 : 0.6 ml/min
 検出波長: 220 nm
 保持時間: 18.183 分

20 実施例 3

モノメトキシポリエチレングリコール コハク酸修飾HGF

HGF 3.87 mg を溶解した 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0,
 0.3 M-NaCl) 6.85 ml に 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え
 て pH 8.24 に調整させた後、モノメトキシポリエチレングリコール
 25 コハク酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (平均分子量約 5000)
 3.14 mg (アミノ基に対して 0.3 eq.) を加え、室温で 1 時間
 握拌した。

反応液に 0.1 N 塩酸を加えて pH 6.5 としたのち セファクリル S
 - 200 HR (2.6 cmφ × 90 cm) を用いたゲル滻過クロマトグラフィ
 30 - (溶出液: 0.2 M 食塩水, 流速: 1.4 ml/min, 検出波長: 2

20 nm) で精製した。目的のフラクションを集め、限外濾過（アミコン YM-5）によって脱塩濃縮し、表題化合物を含む水溶液 1. 60 mlを得た。（蛋白含量 1. 813 mg/ml, アミノ基修飾率： 33 %）

アミノ酸分析値

Asx 62. 5 (83), Glx 49. 8 (59),
 Ser 31. 0 (38), Gly 55. 1 (57),
 His 19. 4 (22), Arg 33. 3 (41),
 Thr 31. 8 (38), Ala* 21. 0 (21),
 Pro 35. 5 (44), Tyr 23. 9 (32),
 Val 26. 9 (33), Met 13. 0 (15),
 Ile 31. 9 (37), Leu 35. 8 (37),
 Phe 16. 1 (17), Lys 40. 9 (41),
 Cys - (40)

*基準アミノ酸、() 内は理論値、-は未測定

15 GPC

カラム： TSK gel G3000 SW

7. 5 mmφ × 600 mm (東ソー社製)

溶出液： 10 mMトリス緩衝液, 0. 2 M食塩水, 0. 05 % SDS

流速 : 0. 6 ml/分

20 検出波長 : 220 nm

保持時間 : 18. 225 分

実施例 4

実施例 1、2 及び 3 の化合物を用いて、肝細胞初代培養法による PEG 化 HGF の *in vitro* 活性を測定した。なお、肝実質細胞の培養には、日本エスエルシーより購入した Wistar 系ラット(雄, 8-10 週令)を用いた。

ラットからの肝実質細胞の分離法及び肝細胞の初代培養法は、中村(初代培養肝細胞実験法 学会出版センター発刊 1989) の方法に従って行った。分離した肝細胞は、 FCS を 5 % 含んだ Williams E (WE) 培地を基本とする培地にて 24 時間培養後、各サンプルを一定濃度含んだ無

血清培地と交換し、20時間培養した。

培養後 $5-[^{125}\text{I}]\text{-Iododeoxyuridine}$ ($^{125}\text{I}-\text{UdR}$) を各ウェルに約2 k Bq/well程度で一定濃度添加し、4. 5時間更に培養を続け細胞に $^{125}\text{I}-\text{UdR}$ を取り込ませた。培養終了後、PBS (-) にてプレートを洗浄し、10%トリクロロ酢酸にて細胞を固定した後、1N水酸化ナトリウムに溶解して細胞に取り込まれたRI量をγカウンターにて測定した。その結果を図1に示す。

本結果を基に、1ng/ml, 3ng/mlでの各サンプルのHGFに対する比活性を 2×2 点法にて計算した。各サンプルのHGFに対する比活性は、実施例1の化合物では0.60、実施例2の化合物では0.42、実施例3の化合物では0.50であった。

実施例5

実施例1及び2の化合物を用いて血中動態の検討を行った。ラットは、日本エスエルシーより購入したwistar系ラット(雄、11週齢)を用いた。

1) HGF及びPEG-HGFの標識化

Iodogen法にて標識化を行った。標識化直後のサンプルを10%トリクロロ酢酸にて処理すると、96%以上のアイソトープが沈殿画分に回収されることから、標識化の確認をした。標識化合物は、-80°Cにて凍結保存した。

2) 血中動態測定用の標識化サンプルの調製

各標識化合物に対応したコールドサンプルを、0.25mg/mlとなるように2.5mg/ml HSA, 0.01%Tween 80を含むPBS (-)に溶解した。上記コールドサンプルに、トリクロロ酢酸沈殿画分として $2.2 \times 10^7 \text{ pm}$ の、原則として一定アイソトープ量の標識化合物を添加して、血中動態測定用サンプルを調製した。この血中動態測定用サンプル中に添加された標識化合物の蛋白量は、コールドサンプルに対して4%以下であった。標識化サンプルを添加することで、血中動態測定用サンプルのHGF濃度は、0.23mg/mlに希釈された。

3) 標識化サンプルのラットへの投与と血液採取

ラットへ、各標識化サンプルを $2 \text{ ml} / \text{kg}$ にて尾静脈より投与した。1群2匹のラットを各サンプルについて2群用い、サンプル投与後、1群では2, 5, 10, 30分で、もう1群では10, 20, 30, 45, 60分で眼窩より経時的に採血した。

5 4) 血清の分離とアイソトープ量の測定

採取した血液より分離した分離血清を $100 \mu\text{l}$ ずつチューブにとり、10%トリクロロ酢酸を加えて遠心分離し、上清を除いて沈澱画分を得た。この沈澱画分中のアイソトープ量を標識化したHGF或いはPEG-HGFに由来するものとして、 γ -カウンターにて測定した。得られたカウントの平均値を基にして、モデルに当てはめて計算される理論血中推移を得た。その結果を図2に示す。

本実験では、投与直後の血中動態から検討し、投与0時間における血中アイソトープ量を計算して、サンプル投与量の同等性を確認した。

10 図2から血中半減期を求めると、各サンプルの血中半減期(分)は、HGFが59.2分、実施例1の化合物が76.7分、実施例2の化合物が95.6分であった。このように、PEG化HGFは、生体内での安定性が改善され、HGF作用を長期にわたって持続させることができることが明らかになった。

20 実施例6

3, 4-ビスマートキシポリエチレングリコールハイドロ桂皮酸修飾HGF

25 HGF 148.3mgを溶解した10 mMリン酸緩衝液(pH 6.5、1M-NaCl、0.01%Tween 80) 3.19mlを11.64mlの0.1Mホウ酸緩衝液(pH 8.21、1M-NaCl)で希釈した後、0.1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 8.21に調整させた後、3, 4-ビスマートキシポリエチレングリコールハイドロ桂皮酸ニアヒドロキシスクシンイミドエステル(平均分子量10,000) 239.2mg(アミノ基に対して0.3eq.)を加え、室温で18時間攪拌した。

反応液に0.1N塩酸を加えてpH6.5としたのち、セファクリルS-200HR(5.0cmφ×49cm)を用いたゲルfiltrationクロマトグラフィー(溶出液:0.2M食塩水、流速:1.4ml/min、検出波長:220nm)で6回に分けて精製した。

目的のフラクションを集め、限外濾過(アミコンYM-5)を繰り返すことによって、表題化合物を含む0.15MNaCl溶液21.0mlを得た。(蛋白含量4.73mg/ml、アミノ基修飾率:29%)

アミノ酸分析値

Asx	70.3 (83)	, Glx	55.9 (59)	,
Ser	34.0 (38)	, Gly	56.0 (57)	,
His	23.1 (22)	, Arg	40.7 (41)	,
Thr	32.1 (38)	, Ala	*21.0 (21)	,
Pro	38.2 (44)	, Tyr	27.7 (32)	,
Val	26.8 (33)	, Met	18.1 (15)	,
Ile	32.5 (37)	, Leu	33.9 (37)	,
Phe	15.4 (17)	, Lys	42.5 (41)	,
Cys-	(40)			

*基準アミノ酸、()内は理論値、-は未測定

GPC

カラム:	TSK gel G3000SW
	7.5mmφ×600mm(東ソー社製)
溶出液:	10mMトリス緩衝液、0.2M食塩水、0.05%SDS
流速:	0.6ml/分
検出波長:	220nm
保持時間:	17.95分

実施例7

実施例6で合成したPEG化HGFと未修飾HGFとのin vivoで薬効を比較するため、同じタンパク量のサンプルをラットに投与し、肝臓における蛋白(フィブリノーゲン)産生亢進作用の比較を行った。

正常ラット (F 3 4 4 / N、雄性、7週令) に、溶媒である 10 mM クエン酸緩衝液 (0.3 M NaCl、0.01% Tween 80 含有、pH 5) に溶解した実施例 6 の PEG 化 HGF 及び未修飾 HGF を 0.05、0.15、0.5 mg 蛋白 / kg の用量で、1 日 2 回尾静脈より投与した。
5 1 群には 5 匹のラットを用いた。2 日間の投与翌日に、エーテル麻酔下、腹大静脈よりクエン酸処理血液を得、全自動血液凝固測定装置 (CA5000 Cy smex) にてフィブリノーゲン量 (mg / d l) を測定した。

測定結果を図 3 に示した。

10 図 3 の結果をもとに、0.3 mg / kg / day と 1 mg / kg / day の 2 用量にて 2 × 2 点の平行線検定を行い、2 剤の効力を比較したところ、PEG 化 HGF は HGF に比較して 8.6 倍の効力を示した。

15

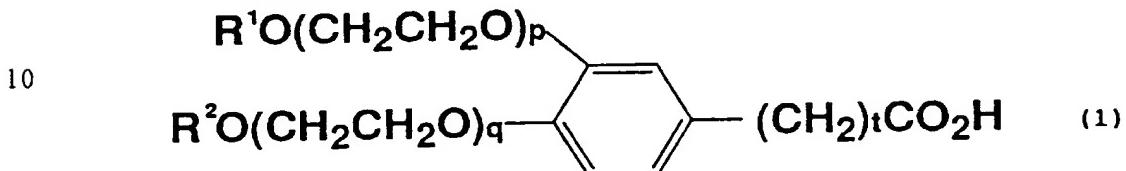
20

25

30

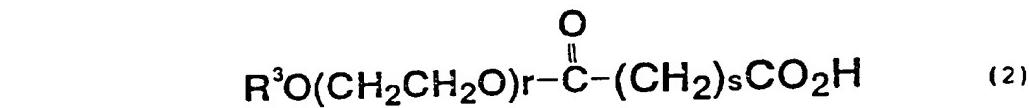
請 求 の 範 囲

1. PEG化HGF。
2. リジン及びタンパクのN末端アミノ基を修飾するPEG化試剤で修飾したHGFからなるPEG化HGF。
5
3. アミド結合を介してリジン及びタンパクのN末端アミノ基を修飾するPEG化試剤で修飾したHGFからなるPEG化HGF。
4. 一般式(1)



(式中、R¹及びR²は同一又は異なる低級アルキル基を、p及びqは同一又は異なって20ないし280の整数を表し、tは0又は任意の正の整数を表す)で示されるPEG化試剤のカルボキシル基を活性化してHGFと反応させることによって得られるPEG化HGF。
15

5. 一般式(2)



(式中、R³は低級アルキル基を、rは20ないし280の整数を表し、sは任意の正の整数を表す)で示されるPEG化試剤のカルボキシル基を活性化してHGFと反応させることによって得られるPEG化HGF。

6. 請求の範囲第1項から第5項の何れかに記載のPEG化HGFの有効量及び必要に応じて担体を含有する肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤又は皮膚化粧剤。
25
7. 肝疾患治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗癌剤、癌療法副作用軽減剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸疾患治療剤、脳神経障害治
30

療剤、血小板増加剤、低蛋白血漿治療剤、創傷治癒剤、造血幹細胞増加剤、
育毛促進剤又は皮膚化粧剤を製造するための請求の範囲第1項から第5項
の何れかに記載のPEG化HGFの使用。

5

10

15

20

25

30

図 1

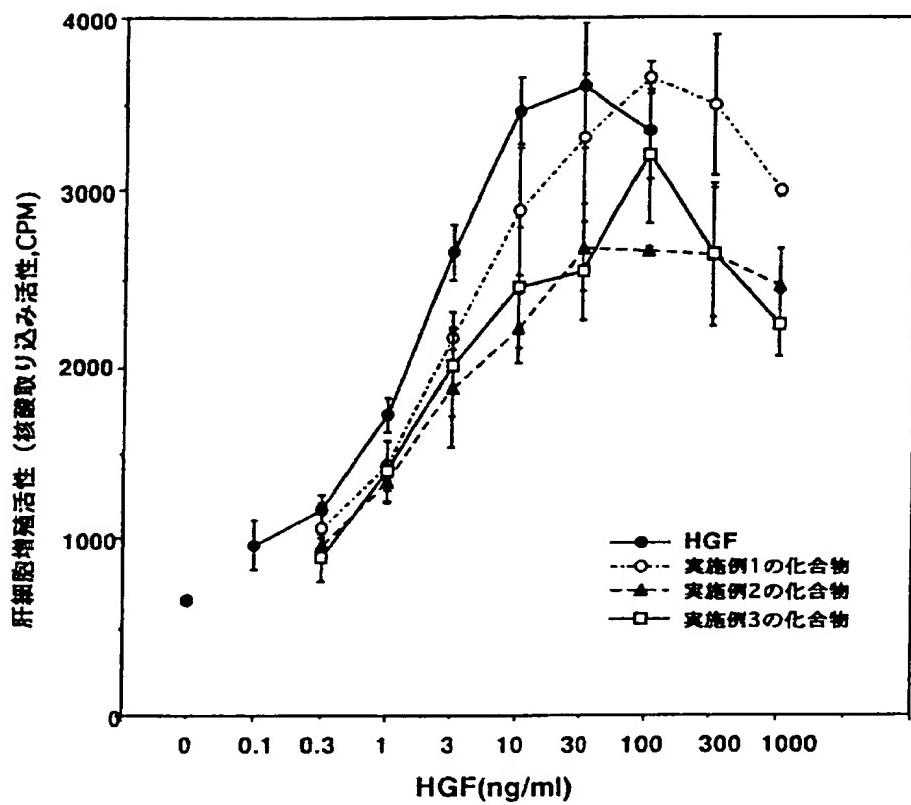


図 2

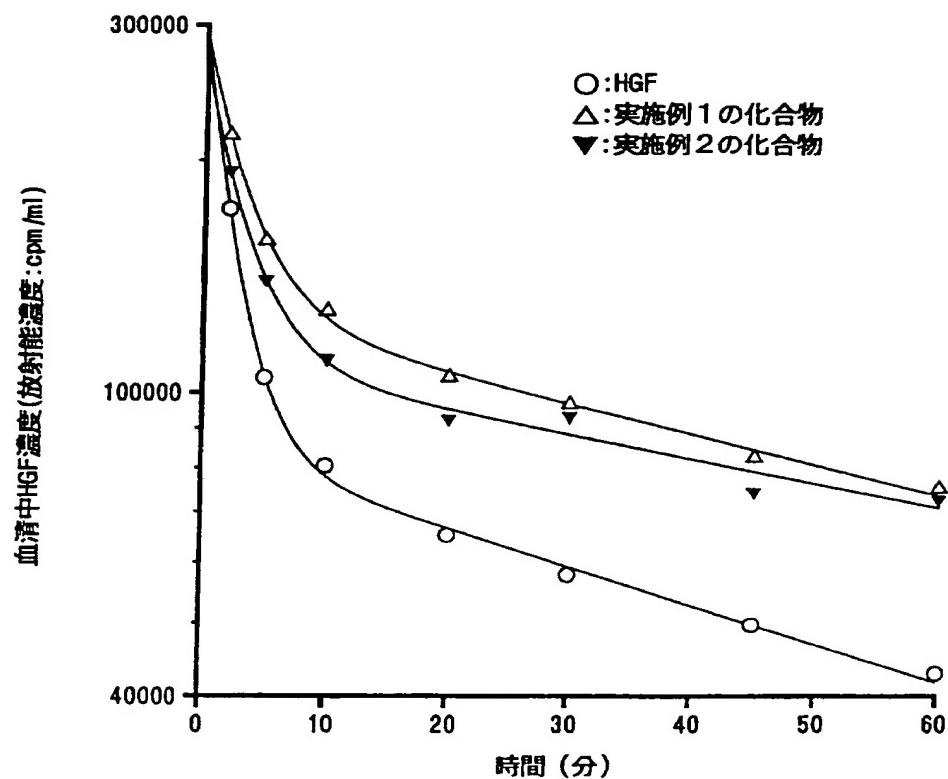
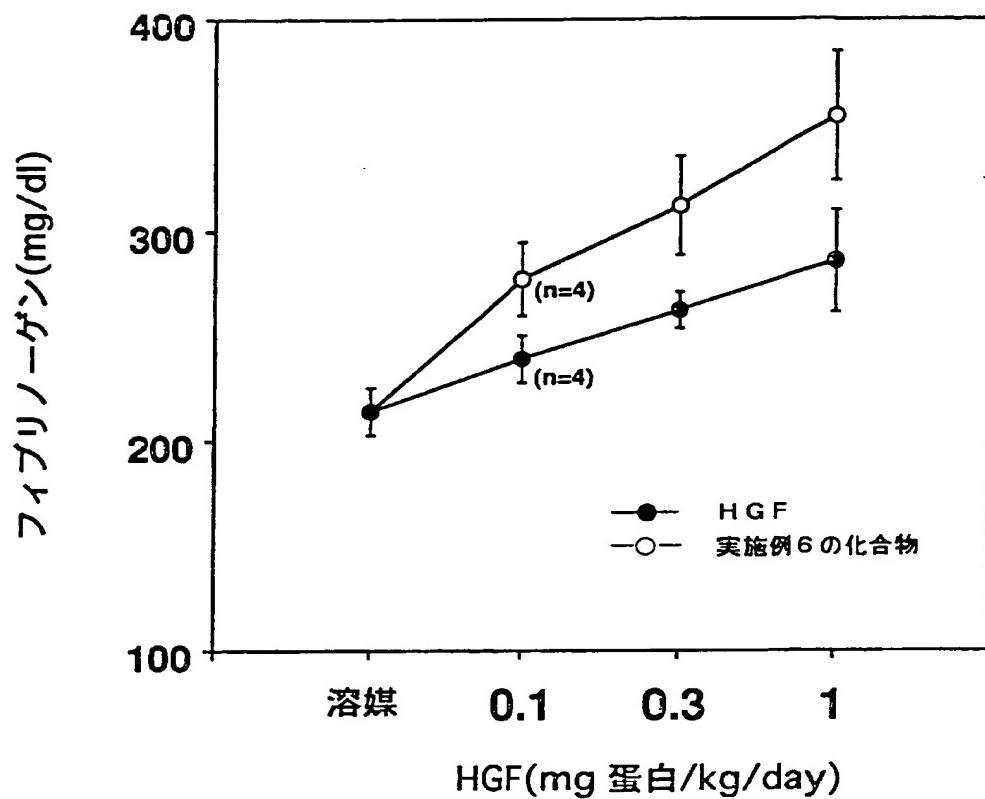


図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K17/08, C07K14/475, A61K38/18, A61K47/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K17/08, C07K14/475, A61K38/18, A61K47/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO, 94/20069, A1 (AMGEN INC.), September 15, 1994 (15. 09. 94), Refer to claim, lines 5 to 16, page 9 & AU, 9463511, A1 & ZA, 9401571, A	1-3, 6-7 4 - 5
X Y	WO, 94/23740, A1 (CELTRIX PHARMACEUTICALS INC.), October 27, 1994 (27. 10. 94), Refer to claim, example & AU, 9465863, A1	1-3, 6-7 4 - 5
X Y	JP, 3-95200, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), April 19, 1991 (19. 04. 91), Refer to claim, examples 10, 13, 16, 42 to 44 (Family: none)	1-3, 6-7 4 - 5
Y	JP, 4-108827, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), April 9, 1992 (09. 04. 92), Refer to claim & EP, 473084, B1 & CA, 2050063, A & US, 5183660, A	4 - 5

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 4, 1996 (04. 06. 96)

Date of mailing of the international search report
June 11, 1996 (11. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00599

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	& DE, 69114614, A1 JP, 61-249388, A (Ajinomoto Co., Inc.), November 6, 1986 (06. 11. 86), Refer to claim, lines 10 to 16, lower right column, page 2 & EP, 200467, B1 & DE, 3676544, A1 & US, 5066590, A	4 - 5

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C07K17/08, C07K14/475, A61K38/18, A61K47/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C07K17/08, C07K14/475, A61K38/18, A61K47/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 94/20069, A1 (AMGEN INC.) , 15. 9月. 1994 (15. 09. 94), 特許請求の範囲及び第 9 頁第 5 行～第 16 行参照, & AU, 9463511, A1 & ZA, 9401571, A	1 - 3, 6 - 7 4 - 5
X Y	WO, 94/23740, A1 (CELTRIX PHARMACEUTICALS INC.) , 27. 10月. 1994 (27. 10. 94) , 特許請求の範囲及び実施例参照 & AU, 9465863, A1	1 - 3, 6 - 7 4 - 5
X Y	JP, 3-95200, A (住友製薬株式会社) , 19. 4月. 1991 (19. 04. 91) , 特許請求の範囲及び実施例10, 13, 16, 42～44等参照 (ファミリーなし)	1 - 3, 6 - 7 4 - 5

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 04.06.96	国際調査報告の発送日 11.06.96
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官(権限のある職員) 柳 和子 電話番号 03-3581-1101 内線 3445 印

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP. 4-108827, A (住友製薬株式会社) , 9. 4月. 1992 (09. 04. 92) . 特許請求の範囲参照 & EP. 473084, B1 & CA. 2050063, A & US. 5183660, A & DE. 69114614, A1	4 - 5
Y	JP. 61-249388, A (味の素株式会社) , 6. 11月. 1986 (06. 11. 86) . 特許請求の範囲第 2 頁右下欄第 10 行～第 16 行参照 & EP. 200467, B1 & DE. 3676544, A1 & US. 5066590, A	4 - 5